


I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service, as first class mail, on March 4, 1998, in an envelope addressed to: Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231

2550/KIP




Shahan Islam

#3
515198
M.v.L

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

-----X
Applicant: Norio MIURA, Noboru YAMAZOE,:
Taizo UDA :
Serial No.: 08/985,007 : Examiner:
Filed: December 4, 1997 : Group Art Unit:
For: An Apparatus for Measuring a :
Medical Substance; a Sensor for :
Use in the Apparatus; and a Sensing :
Element for Use in the Sensor :
-----X

LETTER SUBMITTING PRIORITY DOCUMENTS

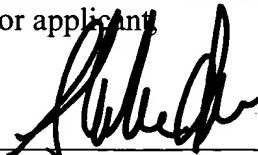
Honorable Commissioner of
Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

Submitted herewith are the two priority documents in the above identified application,
namely:

1. Japanese Patent Application No. 8-340481, filed December 5, 1996; and
2. Japanese Patent Application No. 9-337737, filed November 21, 1997.

Respectfully submitted
For applicant,



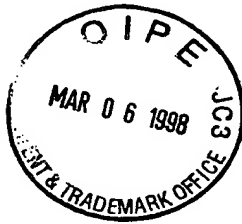
Shahan Islam (Reg. No. 32,507)

SI/kn

Dated: March 4, 1998

FRIEDMAN SIEGELBAUM LLP
Seven Becker Farm Road
Roseland, NJ 07068
(973) 992-1990 Ext. 191

English translation



**PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT**

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application : December 5, 1996

Application Number : Japanese Patent Application
No. 8-340481

Applicant(s) : Norio Miura
Noboru Yamazoe
Taizo Uda
DKK Corporation

Certified on December 19, 1997

Commissioner, Patent Office

Jukoh ARAI (Sealed)

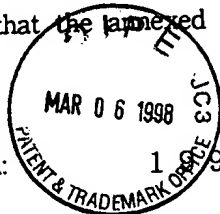
Certification No. 09-3104662

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the appended is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:



1996年12月5日

出 願 番 号
Application Number:

平成 8 年特許願第 3 4 0 4 8 1 号

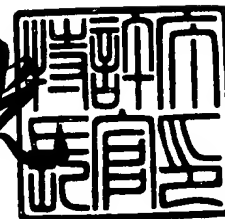
出 願 人
Applicant (s):

三浦 則雄
山添 ▲のぼる▼
宇田 泰三
電気化学計器株式会社

1997年12月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平09-3104662

【書類名】 特許願

【整理番号】 P0007

【提出日】 平成 8年12月 5日

【あて先】 特許庁 長官殿

【国際特許分類】 G01N 21/41

【発明の名称】 薬物の測定装置とセンサ及び該センサに用いる検出素子

【請求項の数】 4

【発明者】

 【住所又は居所】 福岡県福岡市中央区平尾3-17-5-301

 【氏名】 三浦 則雄

【発明者】

 【住所又は居所】 福岡県春日市松ヶ丘4-32

 【氏名】 山添 ▲のぼる▼

【発明者】

 【住所又は居所】 広島県三次市十日市南2丁目13-1-302

 【氏名】 宇田 泰三

【特許出願人】

 【識別番号】 595113314

 【氏名又は名称】 三浦 則雄

【特許出願人】

 【識別番号】 595113303

 【氏名又は名称】 山添 ▲のぼる▼

【特許出願人】

 【郵便番号】 728

 【住所又は居所】 広島県三次市十日市南2丁目13-1-302

 【氏名又は名称】 宇田 泰三

【特許出願人】

 【代表出願人】

 【識別番号】 000217642

【氏名又は名称】 電気化学計器株式会社

【代表者】 山下 直

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 薬物の測定装置とセンサ及び該センサに用いる検出素子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高屈折プリズムの一面に対して装着可能な薄膜基板と、該薄膜基板の一面側に形成された金属薄膜とを備え、前記金属薄膜は前記薄膜基板側と反対の一面側に測定対象としての抗原である薬物を固定化したことを特徴とする薬物の検出素子。

【請求項2】 高屈折プリズムと、該高屈折プリズムの一面に直接または間接的に形成された金属薄膜とを備え、前記金属薄膜は前記高屈折プリズム側と反対の一面側に測定対象としての抗原である薬物を固定化したことを特徴とする薬物のセンサ。

【請求項3】 高屈折プリズムと、該高屈折プリズムの一面に直接または間接的に形成された金属薄膜と、前記高屈折プリズムを通して前記金属薄膜に入射光を供給する光源と、前記高屈折プリズムを通して前記金属薄膜で表面プラズモン共鳴現象が生じる入射光の入射角を検出する検出器とを備え、前記金属薄膜は前記高屈折プリズム側と反対の一面側に測定対象としての抗原である薬物を固定化したことを特徴とする薬物の測定装置。

【請求項4】 高屈折プリズムと、該高屈折プリズムの一面に直接または間接的に形成された金属薄膜と、前記高屈折プリズムを通して前記金属薄膜に入射光を供給する光源と、前記高屈折プリズムを通して前記金属薄膜で表面プラズモン共鳴現象が生じる入射角を検出する検出器と、演算装置とを備え、前記金属薄膜は前記高屈折プリズム側と反対の一面側に測定対象としての抗原である薬物を固定化してなり、前記演算装置は前記金属薄膜の薬物を固定化してある面に、該薬物と特異的に結合する抗体と試料液との混合液を接触させた際の前記入射角の変化量から前記試料液中の薬物量を認定することを特徴とする薬物の測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、表面プラズモン共鳴現象を利用する薬物の測定装置、センサ及びこ

のセンサに用いる検出素子に関する。本発明は、薬物の中でも特に尿や血液等の体液中の薬物、例えばモルヒネ、メタンフェタミン、コカイン、ヘロインなどの低分子量の抗原である有機薬物の測定に好適に使用可能である。

【0002】

【従来の技術】

従来より、尿や血液等の体液中の薬物の測定方法としては、各種の測定方法が採用されている。例えば、クロマトグラフィー、質量分析、沈殿反応による分析、分光分析等の各種の測定方法が挙げられる。

【0003】

しかしながら、これらの測定方法においては、いずれも測定に使用する試料液の調製には、抽出工程や、精製工程等の複雑な前処理工程が必要であり、感度も低く、実用に耐えるものでなかった。

【0004】

一方、最近高感度な測定が可能な分析方法として、表面プラズモン共鳴現象を利用する方法が注目されている。表面プラズモン共鳴現象とは、プリズムの一面に金属薄膜を形成し、プリズムを通してプリズムと金属薄膜の界面で光を反射させた場合、エバネッセント波と表面プラズモンの波数が一致すると共鳴が生じる現象である。表面プラズモン現象が起きると、光エネルギーの一部が表面プラズモンを励起するために使われ、反射光強度が減少する。

【0005】

ここで、エバネッセント波とは、プリズムの外側にしみ出してプリズム表面上を伝播する表面波である。金属が十分に薄い場合、エバネッセント波は金属を通過する。エバネッセント波の波数は光の入射角に依存している。また、表面プラズモンは、表面に局在したプラズマ振動の量子、つまりエネルギーが量子化されることに対応する表面プラズマ振動の素励起である。金属は自由電子が固定した陽イオンの背景の中を動き回っていて固体プラズマとみなすことができ、その表面では表面プラズモンが生じる。表面プラズモンの波数は金属薄膜に接する物質の屈折率に依存する。

【0006】

金属薄膜に接する物質の状態変化により屈折率が変化すると、表面プラズモンの波数が変化し、表面プラズモン現象の起こるエバネッセント波の波数が変化する。つまり、反射光強度の減少するエバネッセント波の波数が変化する。エバネッセント波の波数は光の入射角に依存するため、反射光強度の減少する入射角、すなわち表面プラズモン共鳴現象の生じる入射光の入射角（共鳴角）が変化する。したがって、この入射角すなわち共鳴角を読みとることにより金属薄膜に接する物質の状態（具体的には屈折率）を知ることができる。金属薄膜の表面に接する物質の屈折率が大きくなるほど共鳴角は大きくなる。また、屈折率は一般的に分子量が大きいほど大きい。

【0007】

このことから、抗体を金属薄膜に予め固定化してその抗体と特異的に結合する抗原である薬物を測定することが試みられている。すなわち、抗体を固定化した金属薄膜に薬物を含む試料液を接触させると、試料液中の薬物が抗体に結合して屈折率が変化する。従って、抗体が固定化されているが未だ薬物が結合していない時の共鳴角と、薬物が結合した後の共鳴角を比較すると、その変化量から薬物の量を測定できるものである。

【0008】

しかしながら、尿や血液等の体液中の薬物は通常分子量が数百程度と小さく、これが結合しても十分な屈折率の変化が得られないので、共鳴角の変化も小さい。従って、これらの低分子有機薬物を表面プラズモン共鳴法を利用して直接測定することは困難である。

【0009】

このため、薬物に蛋白質等の高分子を結合して分子量を増大させた標準物質を用意し、この標準物質と試料液中の薬物とを競合的に金属薄膜に固定化された抗体に結合させることにより感度を向上させる方法も提案されている（日本化学会第70春期年会「免疫反応を用いるメタンフェタミンの測定」新井本他）。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記新井本らの提案と同様に、低分子量の薬物であっても、表面プ

ラズモン共鳴現象を利用して、より高感度に、そして、より簡便に測定することのできる測定装置、センサ及びこのセンサに用いる検出素子を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、抗体の方が抗原よりはるかに分子量が大きいので、金属薄膜に予め抗原を固定化しておき、これに抗体が結合すればその量に対応した充分な共鳴角の変化が得られることに着目した。そして、その抗体の量に対応した共鳴角の変化量から、間接的に抗原である薬物の量を測定できる可能性に想到した。具体的には、予め既知量の抗体に試料液を混合反応させ、しかる後に金属薄膜に接触させて試料液中の抗原と反応した残りの抗体を金属薄膜に固定化してある抗原と結合させるという方法を見いだした。本発明は、係る新規な知見に基づく測定方法を実現するために、以下に示すとおり、薬物の測定装置とセンサ、及びこのセンサに用いる検出素子を提供するものである。

【0012】

請求項1に記載した薬物の検出素子は、高屈折プリズムの一面に対して装着可能な薄膜基板と、該薄膜基板の一面側に形成された金属薄膜とを備え、前記金属薄膜は前記薄膜基板側と反対の一面側に測定対象としての抗原である薬物を固定化したことを特徴とするものである。

本検出素子は、表面プラズモン共鳴現象を利用した測定装置に使用する高屈折プリズムに装着するものである。金属薄膜は、直接プリズムに被着する方法もあるが、装置の汎用性を高めるため本検出素子のように、金属薄膜を形成したガラス薄膜等の薄膜基板をプリズムに張り付けて使用方法が通常採用されている。

【0013】

請求項2に記載した薬物のセンサは、高屈折プリズムと、該高屈折プリズムの一面に直接または間接的に形成された金属薄膜とを備え、前記金属薄膜は前記高屈折プリズム側と反対の一面側に測定対象としての抗原である薬物を固定化した

ことを特徴とするものである。

本センサは、表面プラズモン共鳴現象を利用した測定装置の要部を形成するプリズムであって、その一面には薬物を固定化した金属薄膜が、直接にまたは請求項1記載の検出素子を装着する等の間接的な方法で形成されている。

【0014】

請求項3に記載した薬物の測定装置は、高屈折プリズムと、該高屈折プリズムの一面に直接または間接的に形成された金属薄膜と、前記高屈折プリズムを通して前記金属薄膜に入射光を供給する光源と、前記高屈折プリズムを通して前記金属薄膜で表面プラズモン共鳴現象が生じる入射光の入射角を検出する検出器とを備え、前記金属薄膜は前記高屈折プリズム側と反対の一面側に測定対象としての抗原である薬物を固定化したことを特徴とするものである。

本測定装置は、請求項2記載のセンサと光源及び検出器を備えた表面プラズモン共鳴現象を利用した測定装置である。

【0015】

請求項4記載の薬物の測定装置は、高屈折プリズムと、該高屈折プリズムの一面に直接または間接的に形成された金属薄膜と、前記高屈折プリズムを通して前記金属薄膜に入射光を供給する光源と、前記高屈折プリズムを通して前記金属薄膜で表面プラズモン共鳴現象が生じる入射角を検出する検出器と、演算装置とを備え、前記金属薄膜は前記高屈折プリズム側と反対の一面側に測定対象としての抗原である薬物を固定化してなり、前記演算装置は前記金属薄膜の薬物を固定化してある面に、該薬物と特異的に結合する抗体と試料液との混合液を接触させた際の前記入射角の変化量から前記試料液中の薬物量を認定することを特徴とするものである。

本測定装置は、請求項3の測定装置にさらに薬物量を認定する演算装置を加えたものである。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明において、測定の対象としての抗原である薬物に限定はないが、特に低分子量の薬物に好適に適用できる。例えば、メタンフェタミン（分子量：149.24

）やアンフェタミン（分子量：135.21）等の覚醒剤や、モルヒネ（分子量：285.34）、ジアセチルモルヒネ（ヘロイン）（分子量：369.42）、コデイン（分子量：299.37）、コカイン（分子量：303.36）、メサドン（分子量：309.45）、リセルギン酸ジエチルアミド（LSD）（分子量：323.44）等の麻薬、フェノバルビタール（分子量：232.24）、ジアゼパム（分子量：287.74）、ニトラゼパム（分子量：281.27）等の向精神薬、大麻としてテトラヒドロカンナビノール（分子量：314.47）などを好適な例として挙げる事ができる。これらの薬物の分子量は、100～400、実際上は、130～330の範囲内に入る。このような低分子量の薬物に対しては、これまで、表面プラズモン共鳴現象を利用して測定を行っても、薬物の分子量が少ないために金属薄膜上の屈折率の変化を有意に起こさせるものではなく、従って、測定値を再現性良く評価することができなかった。

【0017】

薬物（又は薬物のエピートープ）を認識して特異的に結合する抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でも特に制限なく使用することができる。

モノクローナル抗体は、例えばケーラー・ミルシュタイン（Kohler, Milstein）の方法に従って、容易に製造することができる。一般に、抗原で免疫したマウス等の哺乳類の脾臓細胞等に由来する抗体産生細胞と、マウス等の哺乳類のミエローマ細胞とを融合し、選択培地によって、抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることによって、所望のハイブリドーマを入手し、これを培養してモノクローナル抗体を産生させるか、又はハイブリドーマをマウス等の哺乳類の腹腔内に投与し、腹水からモノクローナル抗体を生成することによってモノクローナル抗体を入手することができる。

【0018】

本発明においては、抗原としての薬物は通常低分子量なので、薬物にキャリアーとしてウシ血清アルブミン（BSA）や、人血清アルブミン等を結合し、免疫原性を付与した後、上記のように免疫することによって、薬物に対する抗体を産生させることができる。

ポリクローナル抗体は、例えば、薬物にキャリアーを付加した後、マウス等の哺乳類に皮下又は腹腔内投与して、その哺乳類から血清を入手し、精製すること

によってポリクロナル抗体を取得することができる。

【0019】

図1は、表面プラズモン共鳴現象を利用する本発明に係る測定装置の一実施形態例を示す構成図である。

本実施形態例に係る装置は、高屈折のプリズム1と、その一面に装着され金属薄膜が形成されている検出素子2と、プリズム1を通して検出素子2の金属薄膜に向けて光を照射する光源3と、プリズム1を通して金属薄膜で反射された反射光を受光して表面プラズモン共鳴現象の生じる入射光の入射角を検出する検出器4と、検出器4の信号を受けて薬物量を認定する演算装置5と、金属薄膜に試料が接触する場としてのフローセル6とから基本的に構成されている。

【0020】

高屈折のプリズム1には、高屈折のものであれば特に限定されることはなく、各種のプリズム用材を使用することができる。このような高屈折プリズム用材としては、例えば、BK7 ($n_d=1.5163$)、SFL6 ($n_d=1.80518$) 等が好適に使用されるが、その材質はガラスに限定されるものではなくプラスチック等であってもよい。また、その形状も特に限定はなく、半球状の他、三角形等ののが使用できる。

【0021】

検出素子2は、カバーガラスと呼ばれるガラス製の薄膜やプラスチック製の薄膜等を基板とする。その一面に形成される金属薄膜としては薄膜化できるものであれば各種の金属を使用することができる。例えば、白金、金、銀、銅、ニッケル、鉄、アルミニウム、ステンレス等が含まれる。特に好ましい金属薄膜としては、金からなる金属薄膜が挙げられる。金属薄膜の厚みは、通常、25～90nm、好ましくは40～60nmである。金属薄膜は、薄膜基板の一面側に蒸着、コーティング等の手法により形成することができる。

【0022】

検出素子2は、金属薄膜が形成された面を外側としてプリズム1に装着される。装着の方法に特に限定はなく、マッチングオイルを用いて表面張力を利用して装着する他、接着による方法やアダプターを用いて圧接させる方法等種々の方法

が採用できる。

【0023】

検出素子2の金属薄膜には、測定対象としての抗原である薬物が薄膜基板と反対の一面側に固定化されている。金属薄膜へ薬物を固定化する方法としては、抗原に蛋白質等を結合させて物理吸着させる方法や、抗原に金属表面に親和性を持つ官能基、例えばチオール基やジスルフィド基等を結合させてから金属に化学結合させる方法等が挙げられる。

【0024】

光源3としては、波長が200～1,300nm、好ましくは400～800nmの各種光源を使用することができる。例えば、650～800nmの光を発光する発光ダイオードを好適に使用することができる。

検出器4としては、例えば、フォトダイオード、リニアアレイ、CCDカメラ等を好適に使用できる。

【0025】

演算装置5は、金属薄膜の薬物を固定化してある面に、該薬物と特異的に結合する抗体と試料液を所定の割合で混合した混合液を接触させた際の共鳴角が、接触させる前の共鳴角と比較してどのくらい変化しているかという検出器4からの情報に基づき、試料中の薬物の量を演算して認定するものである。ここで、認定とは、具体的な濃度値を求めるものの他、試料中の薬物がある濃度を超過しているか否かの判定のように二者択一的な判断等も含む概念である。

【0026】

フローセル6は、試料液等を受け入れる容器であり、その内面には金属薄膜が、抗原を固定化した面を外側にして露出している。フローセル6には入口と出口が設けられ、試料液等（サンプル）が図示しないポンプ等によって循環しながら金属薄膜に接することができる。

【0027】

本実施形態例では、まず、フローセル6にキャリアーを通し、光源3からの入射光をプリズムを通して検出素子2の金属薄膜に当て、その反射光における反射強度が最小となる光の入射角（共鳴角）を「共鳴角（1）」として検出する。

次いで、キャリア代えて、予め反応させておいた抗体と試料液の混合液をフローセル6に通す。この混合液は、測定対象としての抗原である薬物と特異的に結合する抗体を一定量用意し、これと試料液とを混合し抗原抗体反応を起こさせたものである。

そして、混合液を導入した後の共鳴角をモニターしてその値が一定になったとき、混合液中に残存する抗体と金属薄膜に固定化された薬物との抗原抗体反応が終了したものとして、そのときの共鳴角を「共鳴角（2）」として検出する。

【0028】

共鳴角（2）は、金属薄膜に固定化された薬物と結合した抗体の量に応じて、共鳴角（1）よりも大きくなっている。すなわち、試料中の薬物量が少なければ抗体が多量に残存するので大きい共鳴角の変化が得られ、試料中の薬物量が多ければ、抗体が残存する量が減少するので、共鳴角の変化は小さくなる。

従って、予め既知濃度の薬物を含む標準試料液を用いて検量線を作成しておけば、得られた共鳴角の変化量に基づいて試料中の薬物濃度を認定することができる。

【0029】

なお、抗体と試料液中の抗原との抗原抗体反応が完全に終了しない内に混合液をフローセルに導入することも可能である。この場合、残存する抗体は試料中の薬物と固定化された薬物とに競合的に結合することとなる。

【0030】

上記の各抗原抗体反応は、通常5～45℃、好ましくは20～35℃で行うことが適当である。また、より高い測定精度を求める場合には、この温度範囲内で、一定温度に温度調節することが望ましい。

【0031】

測定が終了した後のセンサは、酸又はアルカリの洗浄液をフローセル6に導入すると、結合した抗体が解離するので再生して繰り返し使用することが可能である。

【0032】

なお、本実施形態例においては、請求項2に係るセンサは検出素子とプリズム

から構成されるが、薄膜基板に形成したのと同様の手法で金属薄膜をプリズムに直接蒸着等し、薬物を固定化することによっても本発明に係るセンサが構成される。

【0033】

また、本実施形態例における演算装置5は請求項3に係る測定装置では必須の構成要素ではない。なお、演算装置5を備えない測定装置においては、検出器4からの信号を外部の記録計やパーソナルコンピュータ等に供給することにより、薬物量の認定が可能となる。

【0034】

また、本実施形態におけるフローセル6に変えて、バッチ式のセルを備えてもよい。この場合、センサを下部に設けて、金属薄膜がセルの底面位置で露出するように構成することが考えられる。なお、セルを有しない測定装置においては、試料液等の入った容器に、センサを浸けて使用することが考えられる。

【0035】

【実施例】

以下、本発明について、実施例により更に詳細に説明するが、本発明の範囲は実施例によって限定されるものではない。なお、実施例1はモルヒネを、実施例2はメタンフェタミンを、本発明に係る装置で測定した例である。

【0036】

(1) 実施例1

測定装置の説明

表面プラズモン現象を利用した測定装置として、電気化学計器(株)製SPR-20型を使用した。この装置はフロー型であり、試料液等を循環して流し、センサ上で十分な時間反応を行わせることができる。光源は発光ダイオードでありその波長は680nm、検出器はCCDカメラである。プリズムの材質はBK7で、その一面に下記に示す検出素子をマッチングオイルを用いて装填した。

【0037】

検出素子の作成

金を蒸着したカバーガラス(Matsunami Glass社製)に以下の

手順でモルヒネを固定化した。

【0038】

①ノルモルヒネの合成

モルヒネの脱メチル反応は、Brineらの方法に準じて以下のようにして行った。モルヒネ (3.82 g) をクロロホルム (190 ml) に溶解後、メチルクロロフォーマート (20.9 g) および炭酸水素ナトリウム (16.0 g) を加えて、8時間加熱還流。反応物から無機物を濾別後、無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒を減圧留去して残渣 (淡黄色粘稠液) を得た。残渣に、97%抱水ヒドラジン (11.4 ml) を加え、引続きさらに64%抱水ヒドラジン (15.2 ml) を追加して12時間加熱還流。析出した結晶を水、アセトン、クロロホルムで洗浄して目的物 (2.81 g) を得た。目的物かどうかは核磁気共鳴法 (NMR) で確認した。

【0039】

②N-(4-フタルイミドブチル) ノルモルヒネの合成

ノルモルヒネ (2.81 g) をジメチルホルムアミド (64 ml) に溶解後、N-(4-プロモブチル) フタルイミド (4.39 g) および炭酸水素ナトリウム (1.31 g) を加え、2時間加熱還流。反応物から酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒を減圧留去して、残渣 (黒褐色粘稠液) を得た。残渣をシリカゲルカラム (ワコーゲルC-200, 500 ml, 展開溶媒 酢酸エチル→酢酸エチル:メタノール=9:1) で精製した。TLC (展開溶媒 酢酸エチル:メタノール=5:1) で $R_f=0.60$ のスポットのみを示す画分を分取し、溶媒を減圧留去して、目的物 (4.04 g) を得た。目的物かどうかは質量分析法 (MS) で確認した。

【0040】

③N-(4-アミノブチル) ノルモルヒネの合成

N-(4-フタルイミドブチル) ノルモルヒネのヒドラジン分解は、副反応を押さえるために、Riceらの方法を参考にして、反応系にアリルアルコールを加えて、以下のようにして行った。

N-(4-フタルイミドブチル) ノルモルヒネ (944 mg) に、アリルアル

コール (2.2 ml) と 90% 抱水ヒドラジン (7.9 ml) を加え、窒素雰囲気下で一時間加熱還流。反応物から溶媒を減圧留去した残渣をシリカゲル (ワコゲル C-200) カラムで精製 (展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水 = 10:10:1) した。TLC (展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水 = 10:10:1) で $R_f = 0.25$ のスポットのみを示す画分を分取し、溶媒を減圧留去して、目的物 (618 mg) を得た。目的物かどうかは MS で確認した。

【0041】

④ N-(4-アミノブチル) ノルモルヒネとウシ血清アルブミン (BSA) とのコンジュケート (MO-BSA) の合成

N-(4-アミノブチル) ノルモルヒネ (15 mg) をジメチルホルムアミド (0.3 ml) に溶解させたものと、BSA 水溶液 (10 mg/1.5 ml) とを混合後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) の 10% 水溶液を 0.5 ml を加え、pH を 5.5 に調整し、室温で 16 時間攪拌した。超純水に対して透析後、凍結乾燥して、N-(4-アミノブチル) ノルモルヒネと BSA とを結合させたもの (MO-BSA: 10 mg) を得た。

【0042】

⑤ MO-BSA の金属薄膜への固定化

フローセルに 100 ppm の MO-BSA を共鳴角が一定になるまで (約 3~5 分) 室温で循環して流通し、金属薄膜に吸着させた。その後、1000 ppm の BSA を共鳴角が一定になるまで (約 3~5 分) 室温で循環して流通させ、これ以上の物理吸着が生じないようにブロッキングを行った。

【0043】

抗体濃度と共鳴角の変化量の関係

検出素子を作成した後、モルヒネのモノクローナル抗体の溶液をフローセルに導入し、室温で循環して流通させ、抗体濃度と共鳴角の変化量の関係を調べた。

まず、抗体の原液 (1700 ppm) は、前述したケーラー・ミルシュタインの方法で調製した。

この原液を PBS (16.2 mM リン酸水素二ナトリウム、3.8 mM リン酸

二水素ナトリウム、100mM塩化ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム)に溶解し、1~20ppmの抗体溶液を調製した。

【0044】

図2に各抗体溶液と20ppmBSAを導入したときの応答曲線を示す。図2において横軸は時間、縦軸は共鳴角であり、「Sample」と矢印で示してあるのは、各抗体溶液またはBSA(サンプル)の導入を開始した時間を示す。また、図3には応答の濃度依存性を示す。図3は、図2におけるそれぞれのサンプル導入前の共鳴角(1)と、抗原抗体反応が終了して応答が安定したときの共鳴角(2)との差をプロットしたものである。

これにより、導入される抗体濃度の変化に応じて、十分な共鳴角の変化が得られることが確認された。また、20ppmBSAを導入したときはほとんど共鳴角の変化が見られなかったことから、非特異的な物理吸着による影響は小さいと考えられた。

【0045】

モルヒネ濃度と共鳴角の変化量の関係

次に、一定量(5ppm)の抗体とモルヒネ(MO)を予め反応させた混合溶液をフローセルに導入し、室温で循環させ、モルヒネ濃度と共鳴角の変化量の関係を調べた。

5ppm抗体と0.1~100ppbモルヒネの混合液は、上記抗体原液(1700ppm)3 μ lと、所定量のモルヒネをPBSで1mlとしたものを約10分間室温で反応させて得た。

【0046】

図4に各混合液及びモルヒネを含まない抗体溶液1mlを導入したときの応答曲線を示す。図4において横軸は時間、縦軸は共鳴角であり、「Sample」と矢印で示してあるのは、各混合液等(サンプル)の導入を開始した時間を示す。また、図5には応答の濃度依存性を示す。図5は、図4におけるそれぞれのサンプル導入前の共鳴角(1)と、抗原抗体反応が終了して応答が安定したときの共鳴角(2)との差をプロットしたものである。

これにより、導入される混合液中のモルヒネ濃度の変化に応じて、十分な共鳴

角の変化が得られることが確認された。

【0047】

尿中に含まれる他の成分の影響

尿中成分は、免疫反応の感度や特異性に大きな影響を与えると考えられている。そこで、PBSで10～100倍に希釈した尿(urine)を緩衝溶液として用いて、5ppmの抗体溶液を導入し、室温で循環させ、尿濃度と共鳴角の変化量の関係を調べた。

PBSで10～100倍に希釈した尿を緩衝溶液とした5ppm抗体溶液は、上記抗体原液(1700ppm)3 μ lを、尿をPBSで所定の比率にて希釈した緩衝溶液にて1mlとすることにより得た。

【0048】

図6に各尿含有抗体溶液1mlを導入したときの応答曲線を示す。図6において横軸は時間、縦軸は共鳴角であり、「Sample」と矢印で示してあるのは、各尿含有抗体溶液(サンプル)の導入を開始した時間を示す。また、図7には応答の濃度依存性を示す。図7は、図6におけるそれぞれのサンプル導入前の共鳴角(1)と、抗原抗体反応が終了して応答が安定したときの共鳴角(2)との差をプロットしたものである。

これによると、導入される抗体溶液中の尿濃度が10%であると、尿を含まない場合の2倍以上の応答が得られた。これは、尿中に含まれる蛋白質等が非特異的に吸着したためと考えられる。一方、尿を100倍まで希釈すると(1%)、比較的特異的な吸着の影響は軽減されることが確認された。

【0049】

1%の尿を混入したときのモルヒネ濃度と共鳴角の変化量の関係

PBSで100倍に希釈した尿を緩衝溶液として用いて、一定量(5ppm)の抗体とモルヒネを予め反応させた混合溶液をフローセルに導入し、室温で循環させ、尿存在下でのモルヒネ濃度と共鳴角の変化量の関係を調べた。

5ppm抗体と1～10ppbモルヒネの尿含有混合液は、上記抗体原液(1700ppm)3 μ lと、所定量のモルヒネを、PBSで100倍に希釈した尿を緩衝溶液として、1mlとしたものを約10分間室温で反応させて得た。

【0050】

図8に各尿含有混合液1ml (b)と比較のために尿を含まない混合液1ml (a)を導入したときの応答曲線を示す。図8において横軸は時間、縦軸は共鳴角であり、モルヒネと抗体濃度の表示を矢印で示してあるのは、各混合液(サンプル)の導入を開始した時間を示す。また、図9には応答の濃度依存性を示す。図9は、図8におけるそれぞれのサンプル導入前の共鳴角(1)と、抗原抗体反応が終了して応答が安定したときの共鳴角(2)との差をプロットしたものである。

これによると、導入される抗体溶液中の尿濃度が1%であると、尿を含まない場合に比べ10%程度大きな応答が得られたが、モルヒネ濃度が1~10ppbの範囲ではモルヒネの濃度に応じた応答が得られることがわかった。モルヒネ常用者の尿からは、1ppm程度のモルヒネの排出が予想されるので、1%に希釈した尿を用いても10ppb程度の検出値が予想され、実用上も十分に使用可能と考えられる。

【0051】

センサの再生

図2、図4、図6、図8において、「PBS」「pH2.0」「PBS」と矢印で示してあるのは、共鳴角(2)を測定した後、それぞれの位置(時間)において「PBS」「0.1Mグリシン+0.1MNaCl+0.1MHC1」「PBS」をサンプルに代えて導入し、室温で循環させたことを示す。このように酸を導入することにより、抗原抗体間の特異的な結合が解離し、共鳴角がサンプル導入以前の値にほぼ復帰していることが確認される。すなわち、センサの再生が可能なが確認された。

【0052】

また、酸だけでなく、アルカリ溶液の導入によってもセンサを再生することも確認した。すなわち、図10は、5ppmのモルヒネ抗体溶液を導入し、室温で循環させた後、「PBS」「0.1Mグリシン+0.1MNaCl+0.1MNaCl」「PBS」をそれぞれ導入した際の応答図である。この図に示すように、アルカリ溶液の導入によっても共鳴角がサンプル導入以前の値にほぼ復帰し

ている。

【0053】

(2) 実施例2

測定装置の説明

実施例1と同一の装置を使用した。

【0054】

検出素子の作成

金を蒸着したカバーガラス (M t s u n a m i G l a s s 社製) に以下の手順でメタンフェタミンを固定化した。

【0055】

①N-(4-フタルイミドブチル)メタンフェタミンの合成

メタンフェタミン (1.55 g) をジメチルホルムアミド (64 ml) に溶解後、N-(4-プロモブチル)フタルイミド (4.39 g) および炭酸水素ナトリウム (1.31 g) を加え、2時間加熱還流。反応物から酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒を減圧留去して、残渣 (黒褐色粘稠液) を得た。残渣をシリカゲルカラム (ワコーゲルC-200, 500 ml, 展開溶媒 酢酸エチル→酢酸エチル:メタノール=9:1) で精製した。TLC (展開溶媒 酢酸エチル:メタノール=5:1) でR_r=0.60のスポットのみを示す画分を分取し、溶媒を減圧留去して、目的物 (3.00 g) を得た。目的物かどうかはMSで確認した。

【0056】

②N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンの合成

N-(4-フタルイミドブチル)メタンフェタミンのヒドラジン分解は、副反応を押さえるために、Riceらの方法を参考にして、反応系にアリルアルコールを加えて、以下のようにして行った。

N-(4-フタルイミドブチル)メタンフェタミン (700 mg) に、アリルアルコール (2.2 ml) と90%抱水ヒドラジン (7.9 ml) を加え、窒素雰囲気下で一時間加熱還流。反応物から溶媒を減圧留去した残渣をシリカゲル (ワコーゲルC-200) カラムで精製 (展開溶媒 クロロホルム:メタノール:

水=10:10:1)した。TLC(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水=10:10:1)で $R_f=0.25$ のスポットのみを示す画分を分取し、溶媒を減圧留去して、目的物(397mg)を得た。目的物かどうかはMSで確認した。

【0057】

③N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンとウシ血清アルブミン(BSA)とのコンジュケート(MA-BSA)の合成

N-(4-アミノブチル)メタンフェタミン(9.7mg)をジメチルホルムアミド(0.3ml)に溶解させたものと、BSA水溶液(10mg/1.5ml)とを混合後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド 塩酸塩(EDC)の10%水溶液を0.5mlを加え、pHを5.5に調整し、室温で16時間攪拌した。超純水に対して透析後、凍結乾燥して、N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンとBSAとを結合させたもの(MA-BSA:10mg)を得た。

【0058】

⑤MA-BSAの金属薄膜への固定化

フローセルに100ppmのMA-BSAを共鳴角が一定になるまで(約3~5分)室温で循環して流通し、金属薄膜に吸着させた。その後、1000ppmのBSAを共鳴角が一定になるまで(約3~5分)室温で循環して流通させ、これ以上の物理吸着が生じないようにブロッキングを行った。

【0059】

メタンフェタミン濃度と共鳴角の変化量の関係

次に、一定量(5ppm)の抗体とメタンフェタミン(MA)を予め反応させた混合溶液をフローセルに導入し、室温で循環させ、メタンフェタミン濃度と共鳴角の変化量の関係を調べた。

まず、抗体の原液(1700ppm)は、ケーラー・ミルシュタインの方法で調整した。

5ppm抗体と0.1ppb~10ppmメタンフェタミンの混合液は、上記抗体原液(1700ppm)3μlと、所定量のメタンフェタミンをPBSで1

mlとしたものを約10分間室温で反応させて得た。

【0060】

図11に各混合液及びメタンフェタミンを含まない抗体溶液1mlを導入したときの応答曲線を示す。図11において横軸は時間、縦軸は共鳴角であり、「Sample」と矢印で示してあるのは、各混合液（サンプル）の導入を開始した時間を示す。また、図12には応答の濃度依存性を示す。図12は、図11におけるそれぞれのサンプル導入前の共鳴角（1）と、抗原抗体反応が終了して応答が安定したときの共鳴角（2）との差をプロットしたものである。

これにより、導入される混合液中のメタンフェタミン濃度の変化に応じて、充分な共鳴角の変化が得られることが確認された。

【0061】

なお、この実験においても共鳴角（2）を測定した後、それぞれの位置（時間）において「PBS」「0.1Mグリシン+0.1MNaCl+0.1MHCl」「PBS」をサンプルに代えて導入し、室温で循環させている。このように酸を導入することにより、抗原抗体間の特異的な結合が解離し、共鳴角がサンプル導入以前の値にほぼ復帰していることが確認される。すなわち、メタンフェタミンの測定においても、センサの再生が可能なことが確認された。

【0062】

【発明の効果】

本発明によれば、表面プラズモン共鳴現象を利用しているため、試料の着色や不透明さが測定精度に影響を与えることがない。また、少量の試料を用いて短時間での測定が可能である。

【0063】

また、分子量の大きい抗体の結合に基づく共鳴角の変化を求め、この値から間接的に抗原である薬物の濃度を求めているので、低分子量の薬物であっても、精度よく測定することができる。

また、金属薄膜に予め抗体を固定化した場合には、固定化の際の構造変化により、または、固定化後の経時変化により、抗体の免疫活性が低下し、ひいては測定精度の低下をもたらすおそれがある。本発明によれば、測定対象としての抗原

を固定化したので、抗体の免疫活性が低下するという問題がない。

また、測定の際の前処理は、試料液と抗体の混合液を調製するだけですむので、極めて簡便である。

【0064】

上述のように、本発明は、特に低分子量の薬物について、より高感度に、そして、より簡便に測定することのできる測定装置、センサ及びこのセンサに用いる検出素子を提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明に係る測定装置の一実施形態例を示す構成図である。

【図2】

種々の濃度のモルヒネ抗体溶液を導入したときの応答曲線である。

【図3】

種々の濃度のモルヒネ抗体溶液を導入したときの応答の濃度依存性を示す図である。

【図4】

5 p p m抗体と種々の濃度のモルヒネの混合液を導入したときの応答曲線である。

【図5】

5 p p m抗体と種々の濃度のモルヒネの混合液を導入したときの応答の濃度依存性を示す図である。

【図6】

種々の濃度の尿を含有する5 p p m抗体溶液を導入したときの応答曲線である。

【図7】

種々の濃度の尿を含有する5 p p m抗体溶液を導入したときの応答の濃度依存性を示す図である。

【図8】

1 %の尿を含有する場合と含有しない場合における5 p p m抗体と種々の濃度

のモルヒネの混合液を導入したときの応答曲線である。

【図9】

1%の尿を含有する場合と含有しない場合における5ppm抗体と種々の濃度のモルヒネの混合液を導入したときの応答の濃度依存性を示す図である。

【図10】

アルカリ溶液によるセンサの再現を示す図である。

【図11】

5ppm抗体と種々の濃度のメタンフェタミンの混合液を導入したときの応答曲線である。

【図12】

5ppm抗体と種々の濃度のメタンフェタミンの混合液を導入したときの応答の濃度依存性を示す図である。

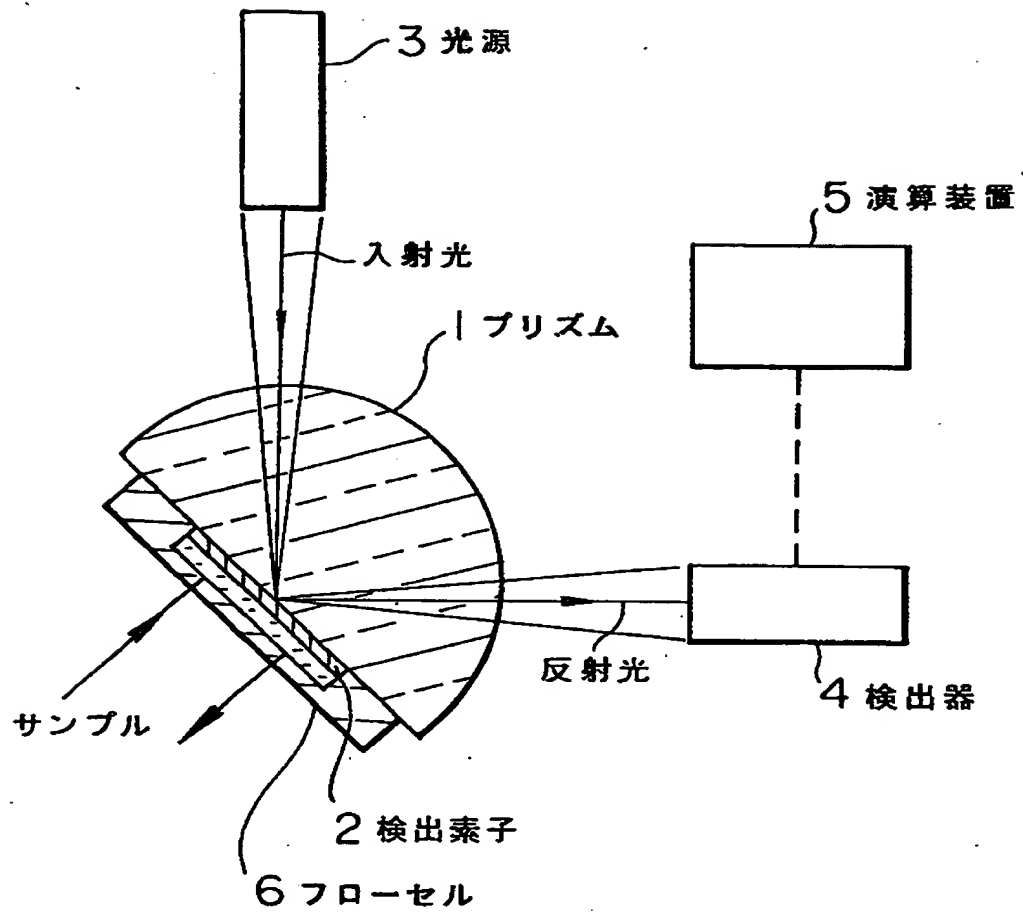
【符号の説明】

- 1 プリズム
- 2 検出素子
- 3 光源
- 4 検出器
- 5 演算装置
- 6 フローセル

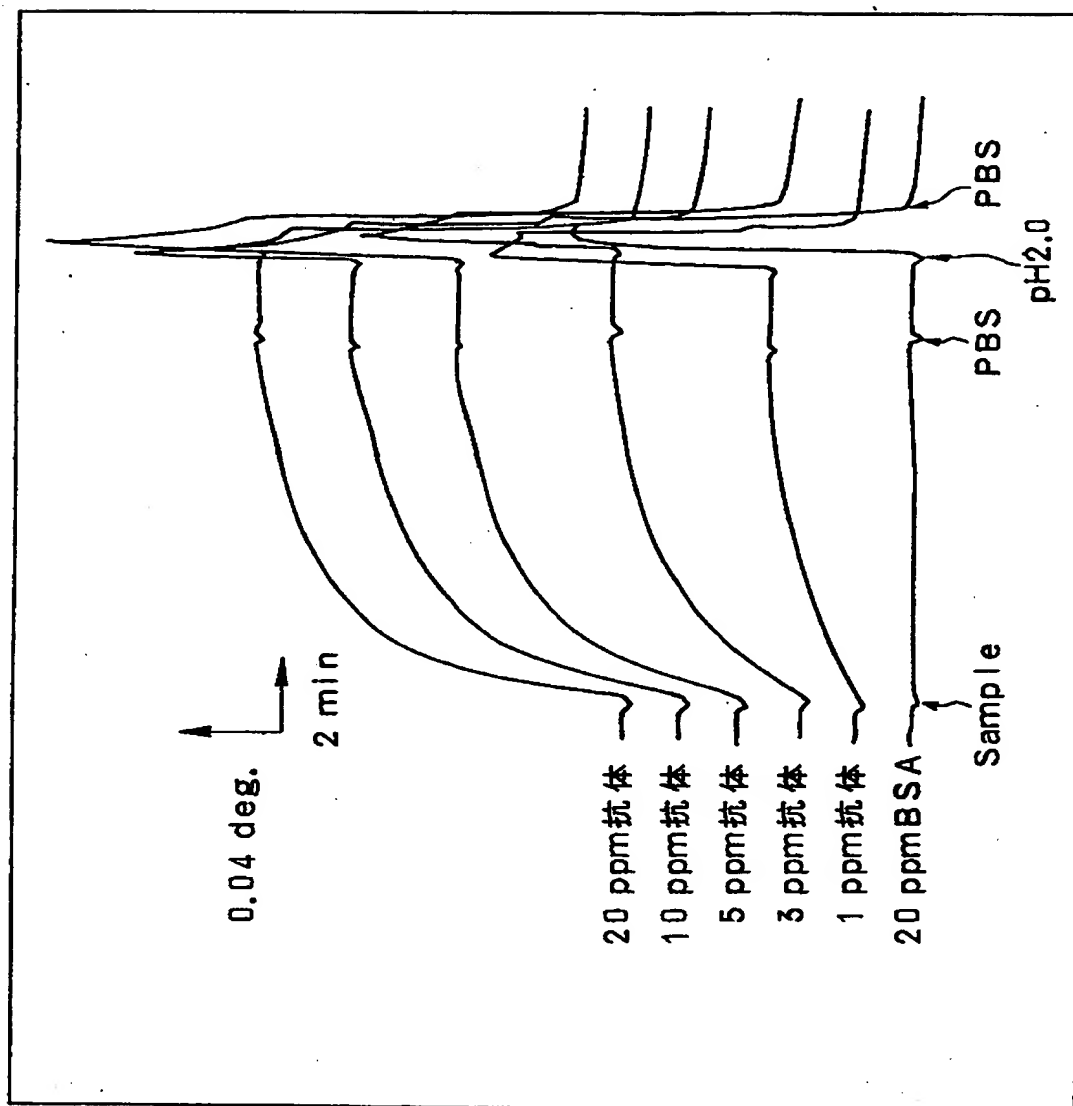
【書類名】

図面

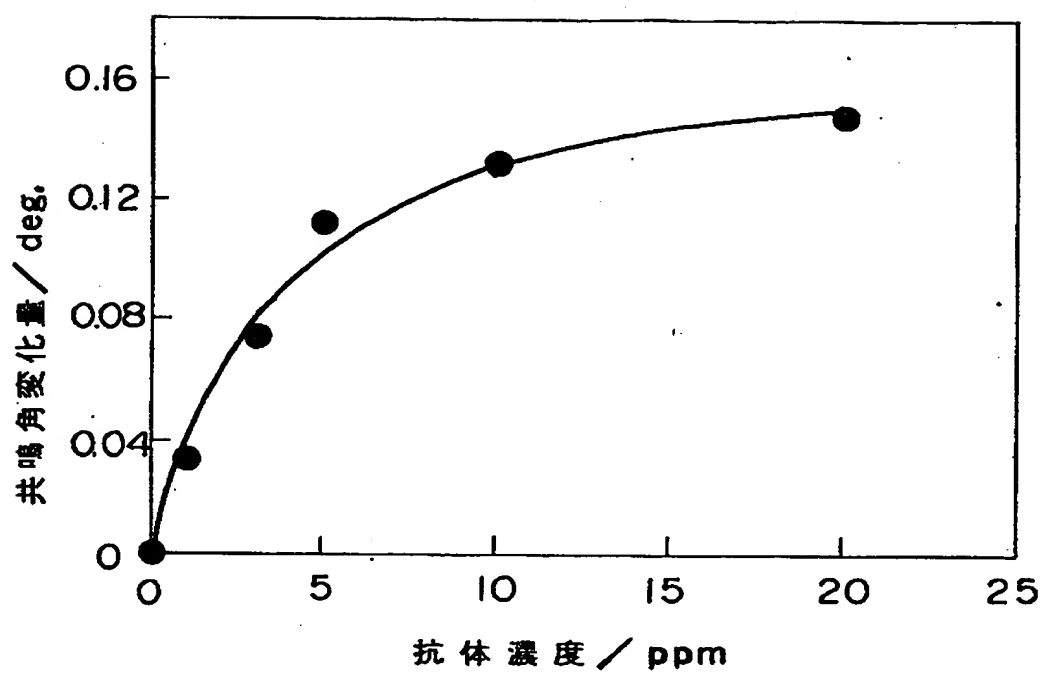
【図1】



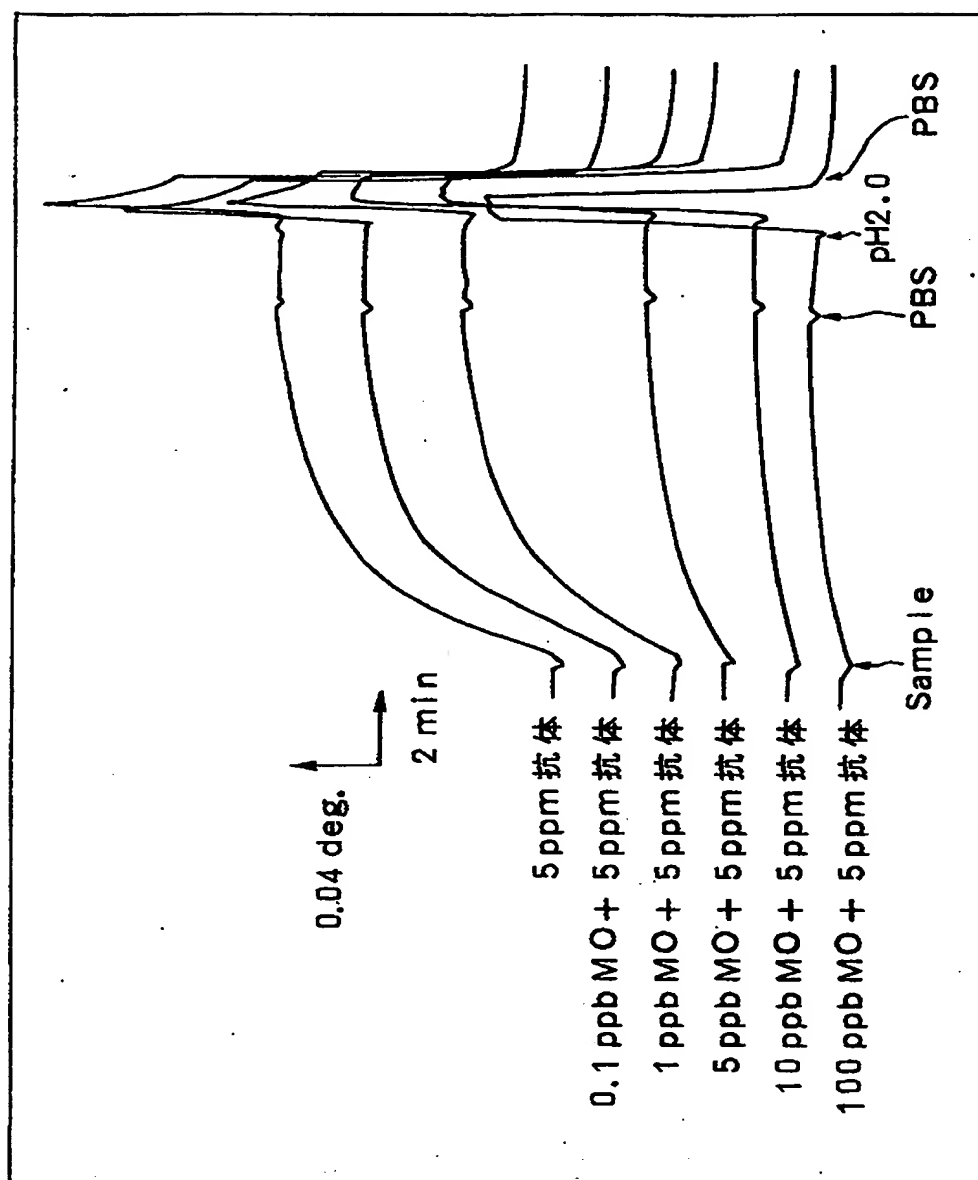
【图2】



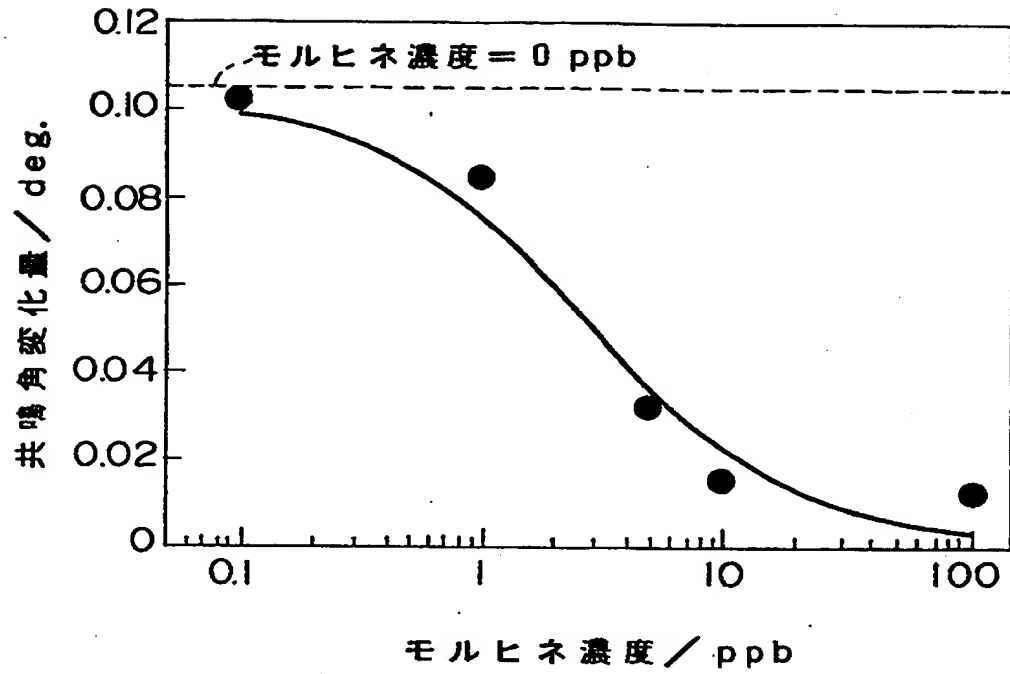
【图3】



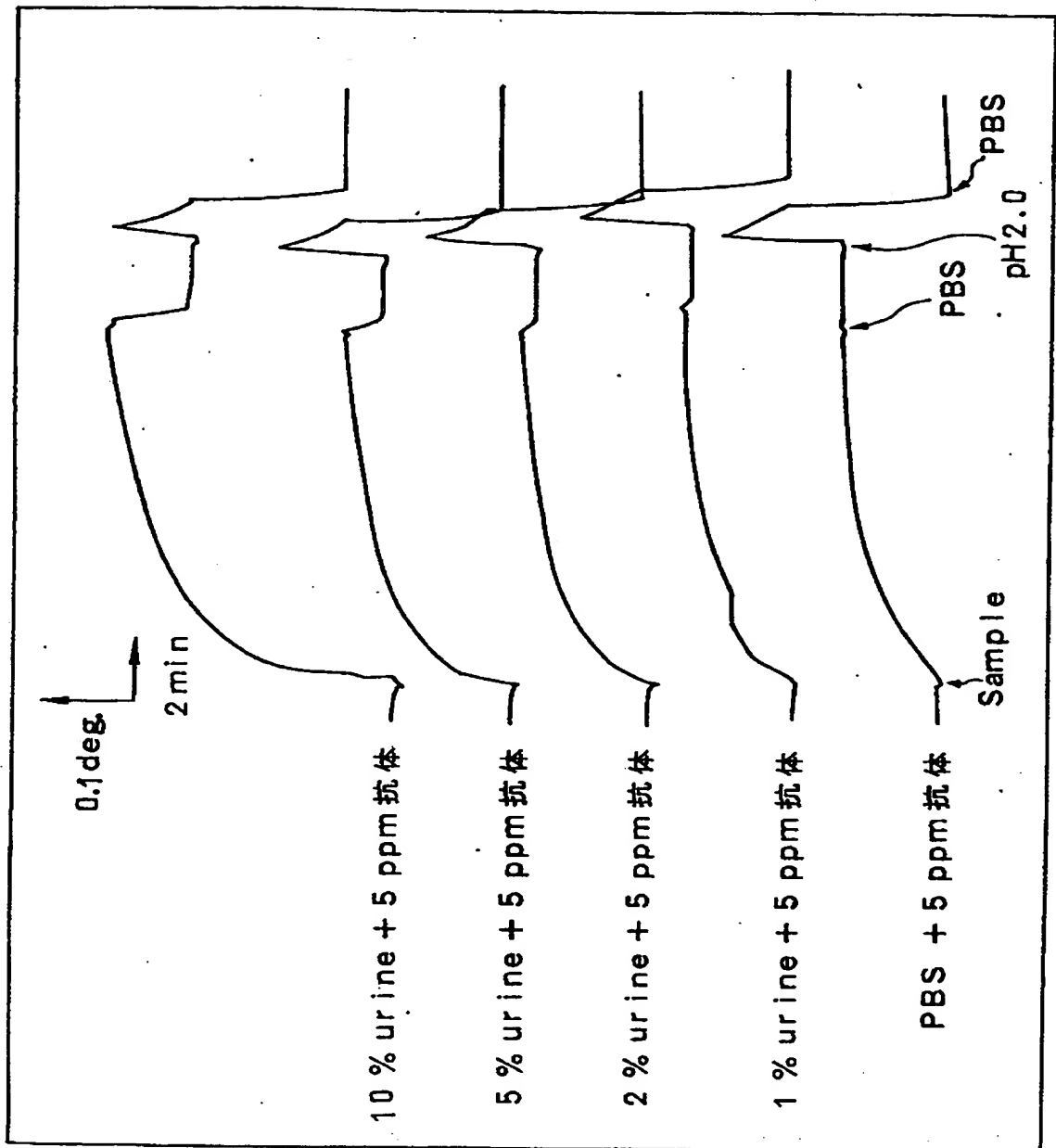
【图4】



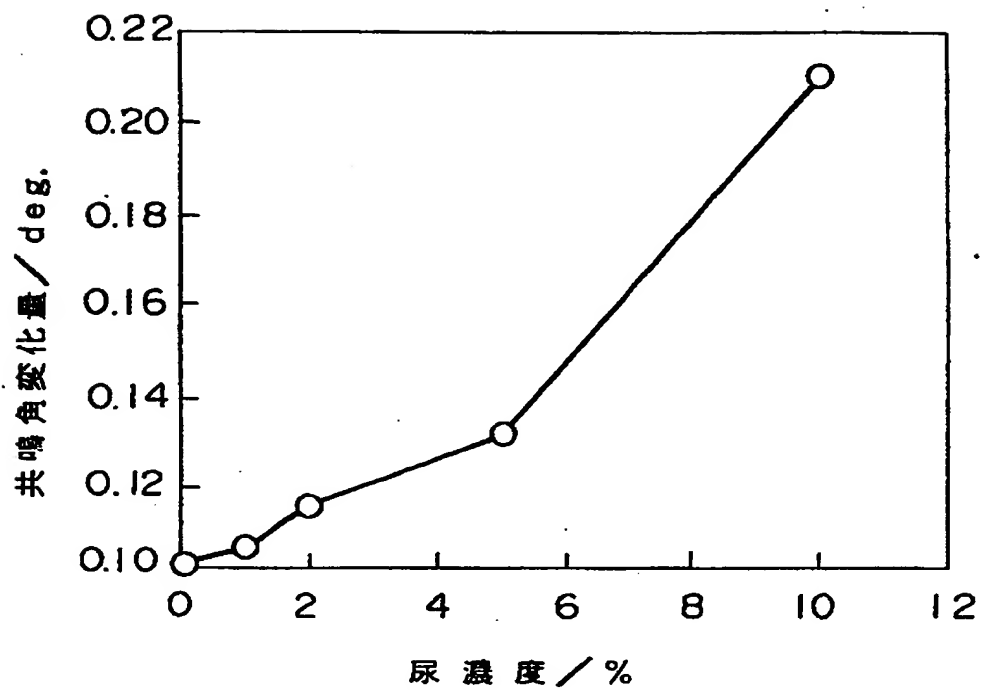
【図5】



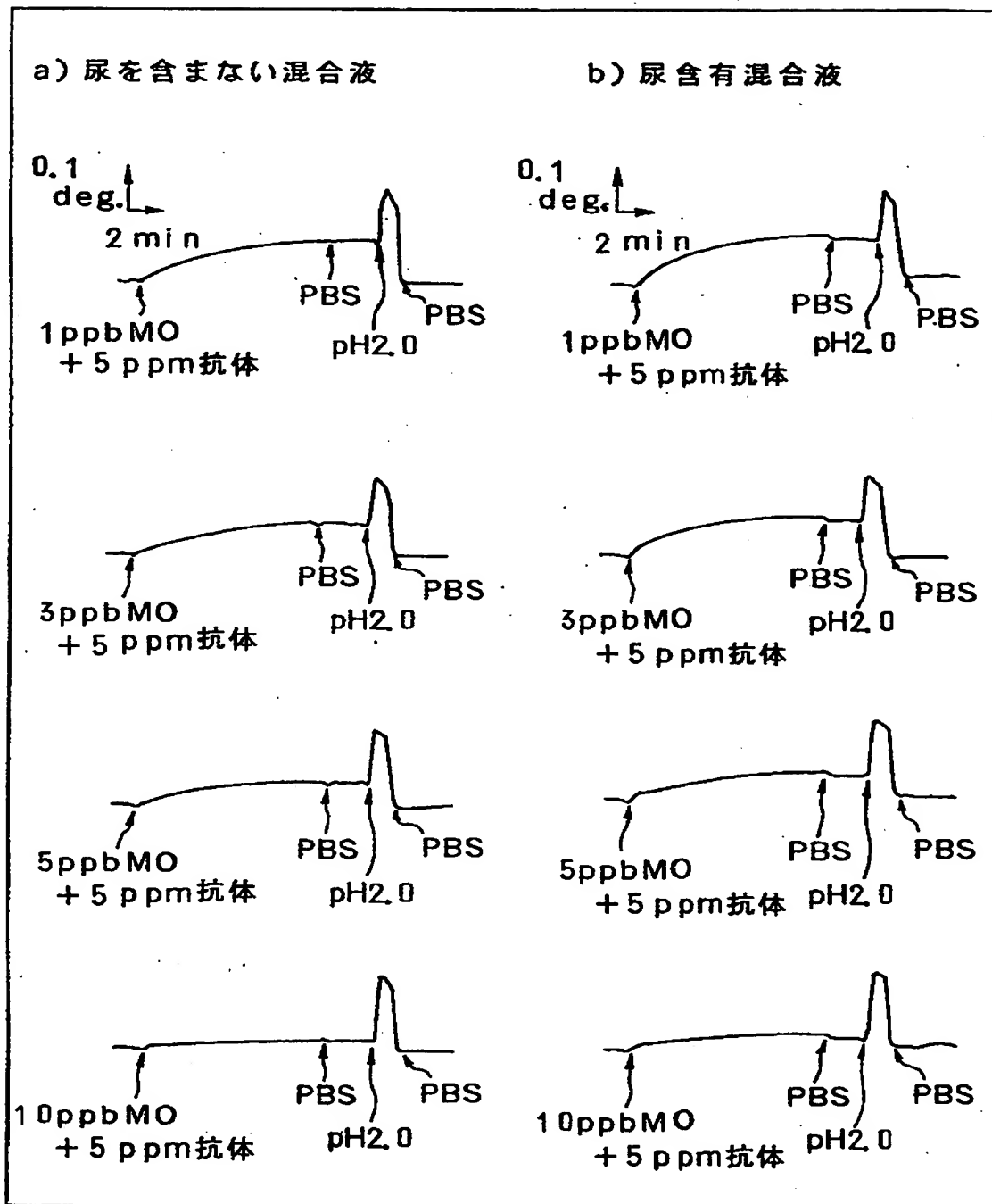
【图6】



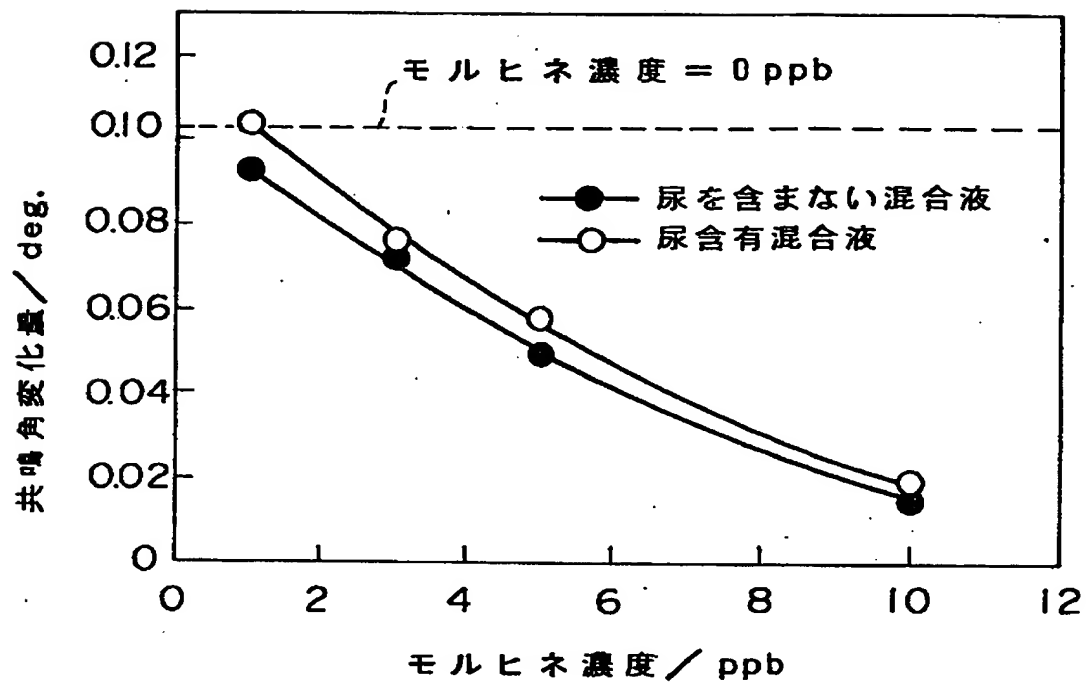
【図7】



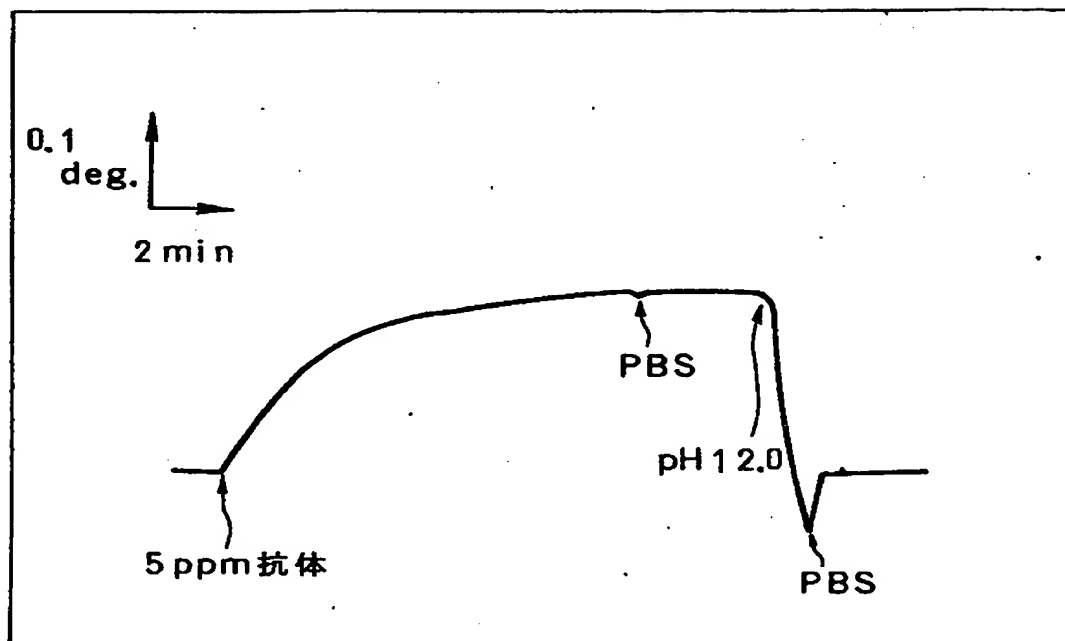
【図8】



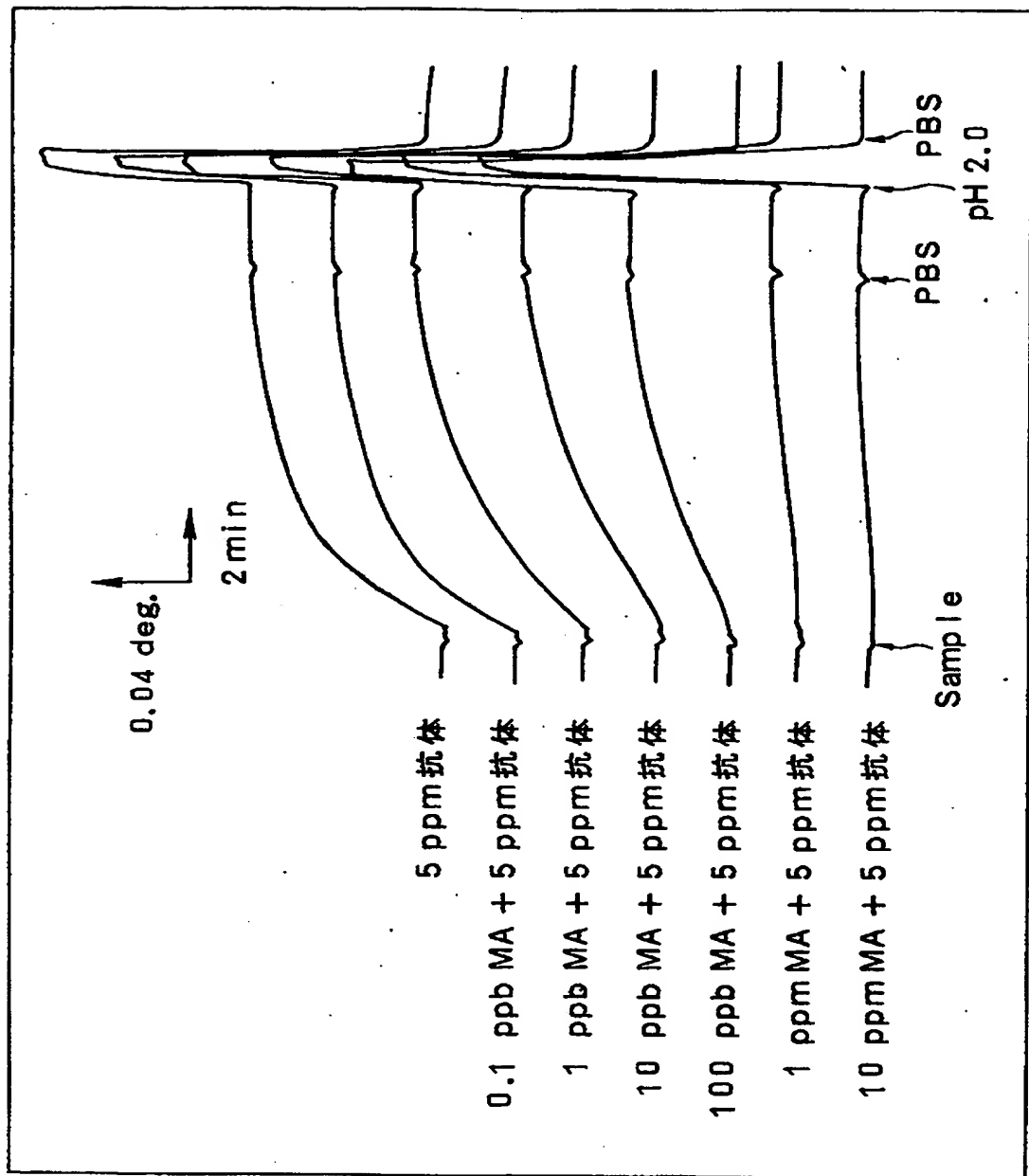
【図9】



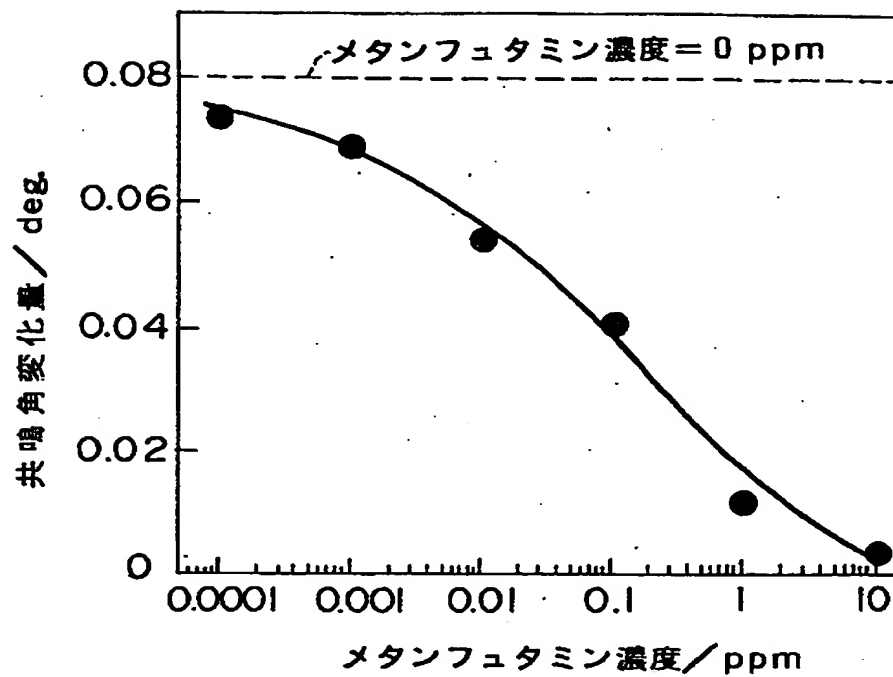
【图10】



【图 11】



【図12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 低分子量の薬物であっても、表面プラズモン共鳴現象を利用して、より高感度に、そして、より簡便に測定することのできる測定装置、センサ及びこのセンサに用いる検出素子を提供する。

【解決手段】 高屈折のプリズム1に、測定対象としての抗原である薬物を固定化した金属薄膜を形成してある検出素子2を装着する。この検出素子2に、薬物と特異的に結合する抗体と試料液の混合液を接触させた際の共鳴角の変化量から試料液中の薬物量を測定する。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 595113314
【住所又は居所】 福岡県福岡市中央区平尾3-17-5-301
【氏名又は名称】 三浦 則雄

【特許出願人】

【識別番号】 595113303
【住所又は居所】 福岡県春日市松ヶ丘4-32
【氏名又は名称】 山添 ▲のぼる▼

【特許出願人】

【識別番号】 596183114
【住所又は居所】 広島県三次市十日市南2丁目13-1-302
【氏名又は名称】 宇田 泰三

【特許出願人】

申請人
【識別番号】 000217642
【住所又は居所】 東京都武蔵野市吉祥寺北町4丁目13番14号
【氏名又は名称】 電気化学計器株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595113314]

1. 変更年月日 1995年 7月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 福岡県福岡市中央区平尾3-17-5-301

氏 名 三浦 則雄

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595113303]

1. 変更年月日 1995年 7月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 福岡県春日市松ヶ丘4-32

氏 名 山添 ▲のぼる▼

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000217642]

1. 変更年月日 1990年 8月23日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都武蔵野市吉祥寺北町4丁目13番14号

氏 名 電気化学計器株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596183114]

1. 変更年月日 1996年12月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 広島県三次市十日市南2丁目13-1-302

氏 名 宇田 泰三